两蛇科毒蛇的毒腺γ-谷氨酰转肽酶组织化学的定位

魏琦 李志尚 朱芳淇 滕映绪 邓巍
（广西医学院 南宁）

摘 要

我们进行眼镜蛇科与蝰蛇科蝰亚科的两种毒蛇：即中华眼镜蛇与罗氏蝰蛇的毒腺组织化学的酶的研究，发现γ-GT存在于大体标本及冰冻切片的腺体上皮层内，中华眼镜蛇腺体γ-GT酶染色强于蝰蛇。

关键词 γ-谷氨酰转肽酶 蛇毒腺 眼镜蛇 蝰蛇

γ-谷氨酰转肽酶（γ-Glutamyl transpetidase γ-GT）（E. C 2.3.2.2）广泛存在于哺乳动物的各种组织中，细菌中亦含有。而毒蛇毒腺是否有此酶存在，国内外尚少报道。我们对中华眼镜蛇 *Naja Naja atra*（Cantor）为代表的眼镜蛇科（Elapidae）毒蛇及罗氏蝰蛇（*Vipira russelii siamensis* Smith）为代表的蝰蛇科(Viperidae)蝰亚科（Viperinae）毒蛇的毒腺的组织化学酶进行研究，观察两蛇科中的毒腺大体标本与冰冻切片标本γ-GT的分布定位。

材 料 与 方 法

（一）活蛇为广西生物制品联合公司供应，总共用22条，其中中华眼镜蛇13条，♂ 9条，体重 404g—605g，身长 95cm—132cm，♀ 4条，体重 426g—520g，身长 95cm—128cm。蝰蛇 9条，♂ 6条，体重500g—630g，身长 80cm—102cm，♀ 3条，体重 550g—600g cm，身长84cm—98cm。

冰冻切片承蒙本院肿瘤研究室同志大力协助，特此致谢。
本文1985年6月17日收到，1986年6月3日收到修改稿。

（二）冰冻切片机为AO公司Cryo—CW型。

（三）试剂：①氯化钠优质纯，广东台山；②三羟甲基氨基甲烷，上海化学试剂厂，生物试剂批号84—07—26；③盐酸分析纯，南宁师范学院化学试剂厂；④ γ-L-谷氨酰α-萘胺生化试剂三厂，批号820913；⑤甘氨酰替甘氨酸（双甘肽），生化试剂上海化工机修三厂；⑥固蓝盐B，上海标本模型厂。

（四）组织化学酶定位实验法：

1.大体标本：将毒蛇断头，在保持毒腺组织细胞结构完整下，剥离肌肉组织，洗涤组织表面的血液，把毒腺切开；一半酶染，一半作对照；对照标本用两块载玻片夹紧、固定好，煮沸5分钟，冷却后两标本同时进行γ-GT酶染色。步骤：将组织块浸泡于底物液30分钟，继续加酶染剂（0.4%固蓝盐B液）1ml染色30分钟；取出用生理盐水洗涤后置载玻片上观察拍照。（底物液配方：γ-L-谷氨酰α—萘胺20mg；双甘肽20mg溶于0.1M Tris—HCl缓冲液生理盐水pH7.3 5ml，酶染剂固蓝盐B20mg加缓冲液5ml）。

2.将两种毒蛇的毒腺（经大体标本处理）冰冻切片标本在AO公司Cry—CW型冰冻切片机上（-25°C）作8微米厚的连续切片，所得切片以间隔染色观察，其一用苏木精—伊红（HE）染色作对照，其二按上述大体标本染色为γ-GT染色片。

结果与讨论

两蛇科毒蛇的毒腺大体标本观察结果：其毒腺结构各不相同，眼镜蛇科之毒腺系外围包膜比较坚实的腺，分三个部分，后部主腺大，其前连接副腺及通毒牙小管，主腺体各小叶有单纯或复合小管，各小管汇集通向中央的管腔。蝰蛇之毒腺略呈三角形，分四个部分，主腺占全毒腺1/2，原管副腺及连接毒牙之次级管，大的中央腺管腔后部有4—5个小叶腺管向前汇合，中央腺管腔向前移行为原管，位于副腺之间，以后进入次级导管通至毒牙，毒腺的大体酶染色标本中，γ-GT均呈阳性反应，表现为境界清楚的桔红色；中华眼镜蛇强于蝰蛇，煮沸标本作为对照，均不显色。（见图版 1、2）

两蛇的冰冻切片标本观察结果：在光学显微镜下看出眼镜蛇科和蝰蛇科毒腺冰冻切片γ-GT的细胞定位，γ-GT分布以毒腺腺体的高柱状上皮细胞最多，γ-GT染色为桔红色较深，低柱状上皮细胞层几乎不显色；中华眼镜蛇冰冻切片酶染色浓度比蝰蛇为深，说明组织切片上γ-GT酶含量眼镜蛇大于蝰蛇，与蛇毒中γ-GT酶含量眼镜蛇比蝰蛇多是一致的。（见图版3—6）

γ-GT应固定于毒腺组织细胞之后再与特定的底物作用，使分解产物经反应后，在原位上变为可见性即底物与酶作用形成α-L谷氨酰γ-L谷氨酰α-萘胺和α-萘胺两个产物；α-萘胺再与固蓝盐B-重氮盐染料偶联呈为桔红色，即酶作为毒腺组织细胞γ-GT定位。

组织化学定位法发现γ-GT结合某些上皮细胞膜上，主要分布在具有吸收分泌功能的组织细胞外膜，这种组织分布的特异性，对氨基酸的吸收或重吸收，从而让细胞内进行蛋白质（或多肽）的生物合成，对谷氨酰循环和硫酰氨基酸（Mercapturic acid）的生物合成等均有重要作用；眼镜蛇科毒腺分泌的蛇毒以神经毒蛋白为主，其分泌的酶则

两蛇科两种毒蛇毒腺冰冻切片γ-GT酶染色定位观察反应结果

蛇种	名称 \ 编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
中华眼镜蛇	性别	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♀	♂
	体重	426g	491g	502g	605g	498g	528g	500g	490g	600g	404g	484g	520g	496g
	身长	95cm	110cm	122cm	132cm	120cm	124cm	120cm	119cm	130cm	96cm	120cm	128cm	118cm
	γGT酶染色反应	+++	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++
蛇种	名称 \ 编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
罗氏蝰蛇	性别	♂	♂	♀	♂	♀	♂	♂	♂	♀				
	体重	630g	608g	600g	560g	570g	600g	500g	600g	550g				
	身长	102cm	100cm	98cm	80cm	90cm	98cm	92cm	95cm	84cm				
	γTG酶染色反应	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++				

有乙酰胆碱酯酶（E.C.3.1.1.7），磷酯酶B（E.C.3.1.1.5）等。而蝰蛇科及蝮亚科毒腺分泌的蛇毒多为血循毒蛋白，酶方面有激肽释放酶（E.C.3.4.4.21），内肽酶，精氨酸酶和凝血酶样酶等。两种毒蛇各不相同（注：分泌的酶也有相同的），因此不同蛇种毒腺的γ-GT的特异性各异，以致分泌蛇毒的毒素以及酶也有不同，这可能启示联系毒腺与蛇毒的关系有一定意义，容待今后进一步探索。

参考文献

朱进华主译 1983 γ-谷氨酰基转移酶《新酶组织化学（武内忠男小川和朗编纂）》：147。

邹道镇等 1984 γ-谷氨酰转移酶大体标本组织化学显示法。中国医学科学院学报 6(1):68—69

Altman P. L. *et al.* 1973 Biology Data Book 2nd Edition I 698.

Elazar Kochva: 1978 chapter 2 "Oral glands of the Reptilia" Biology of the Reptilia. Edited by Carl Gans 8 104—135

Meisler, A and Tate S. S 1976 Glutathione and related γ-Glutamyl Compounds: Bosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem.* 45, 559—604.

Rosenberg H. I. *et al.* 1967 Histology, histochemistry and emptying mechanism of the venom glands of some Elapid snakes. *J. Morph* (123) 133—156

Rusenburg A. M. *et al.* 1969 J. Histochem, cytochem. 17, 517—526

Thomes E Barman: 1969. Enzyme Handbook 1 301 springer verlag New York *Inc.*

William J. Williams and Curtis B Thorne 1954. Biosynthesis of glutamyl peptides from glutamine by a transfer reaction. *J. Biol. Chem.* (210) 203—218.

HISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF γ-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE IN THE VENOM GLANDS OF TWO SPECIES SNAKES FROM TWO FAMILIES

Wei Qi　Li Zhishang　Zhu Fangqi　Teng Yinfan Deng　Wei
(Guangxi Medical College Nanning)

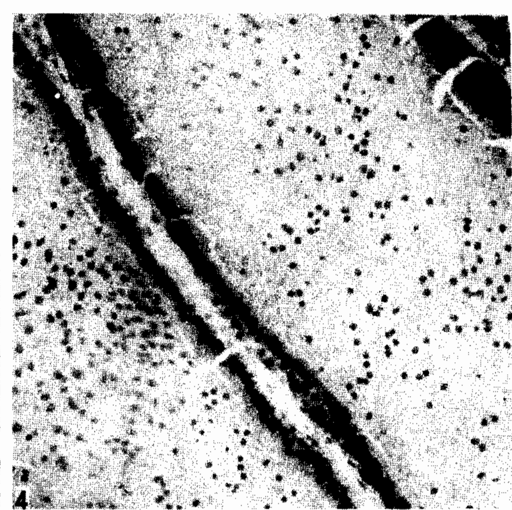
We found the presence of γ-Glutamyl Transpeptidase (γGT, EC 2. 3. 2. 2.) in the venom-glands of two species snakes, Chinese Cobra (Elapidae: *Naja naja atra* Cantor) and Russell's viper (Viperidae: *Vipera russelli siamesis* Smith) with histochemical method on the well preserved intact cells and undamaged tissues of the venom-glands, the whole gland and its frozen slices were reacted by the substrate γ-Glutamyl-α-Naphthyamide and then slained by the fast blue B salt dye. It was found that all of the specimens were positive in contrast to all controls. The glandular Cells of Chinese cobra displayed rather intensive brown-red color than that of Russell's viper. It demonstrated that the γ-GT were mainly located on the cell membrane of the venom-glands. The function of the enzyme γ-GT was discussed.

Key words: Gamma-glutamyl transpeptidase Snake venom-gland Cobra Viper



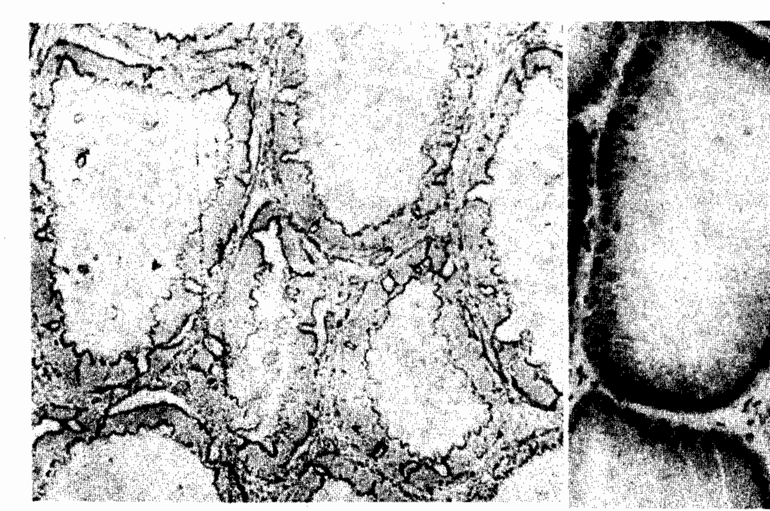
图（3）中华眼镜蛇毒腺冰冻切片

标本γ—GT染色（10×10）



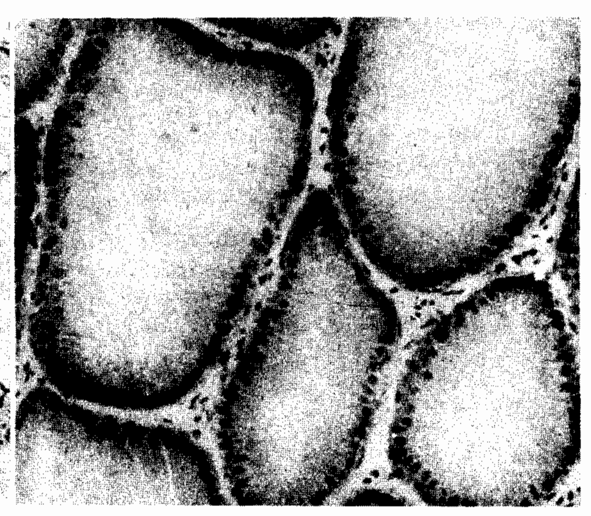
图（4）中华眼镜蛇毒腺冰冻切片

标本HE染色（10×40）



图（5）蝰蛇毒腺冰冻切片

标本γ—GT染色（10×40）



图（6）蝰蛇毒腺冰冻切片

标本HE染色（10×40）